

**Cellular amphipatic proteins in aggregated forms, and procedure for the production and purification of these proteins.**

Patent Number: EP0321606  
Publication date: 1989-06-28  
Inventor(s): EIBL JOHANN DR;; DORNER FRIEDRICH PROF DR  
Applicant(s): IMMUNO AG (AT)  
Requested Patent: ☐ EP0321606, ☐ B1  
Application Number: EP19870119172 19871223  
Priority Number (s): EP19870119172 19871223  
IPC Classification: A61K37/02; C07K3/00; C12P21/02  
EC Classification: C07K1/113, C07K1/113D, C07K14/02, C07K14/16D  
Equivalents: DE3787654D, DK628188, FI885629, FI953141, ☐ FI96864B, ☐ FI96864C, ☐ FI97058B, ☐ FI97058C, ☐ JP2000798, JP2656098B2, NO175782B, NO175782C

---

**Abstract**

---

Proteins produced in cells collect together to form particulate aggregates. The invention relates to the reversible conversion of said aggregated proteins into morphological forms I, II and III which differ from one another, depending on the presence or absence of a non-denaturing detergent. The invention also relates to a process for the isolation and purification of said aggregated forms of proteins produced in cells.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 321 606  
A1

(12)

# EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 87119172.2

(51) Int. Cl.<sup>4</sup> C07K 3/00 , C12P 21/02 ,  
A61K 37/02

(22) Anmeldetag: 23.12.87

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
28.06.89 Patentblatt 89/26

(64) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für  
chemisch-medizinische Produkte  
Industriestrasse 72  
A-1220 Wien(AT).

(72) Erfinder: Eibl, Johann, Dr.  
Gustav Tschermakgasse 2  
A-1180 Wien(AT)  
Erfinder: Dörner, Friedrich, Prof.Dr.  
Peterlinigasse 17  
A-1230 Wien(AT)

(74) Vertreter: Patentanwälte Grünecker,  
Kinkeldey, Stockmair & Partner  
Maximilianstrasse 58  
D-8000 München 22(DE)

(54) Zelluläre amphipatische Proteine in aggregierten Formen und Verfahren zur Herstellung und Reinigung diese Proteine.

(57) In Zellen produzierte Proteine lagern sich zu partikulären Aggregaten zusammen.

Die Erfindung bezieht sich auf das reversible Überführen der genannten aggregierten Proteine in voneinander verschiedene morphologische Formen I, II und III in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Abwesenheit eines nicht denaturierenden Detergenz. Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein Verfahren zum Isolieren und Reinigen der genannten aggregierten Formen von in Zellen produzierten Proteinen.

EP 0 321 606 A1

# Zelluläre amphipatische Proteine in aggregierten Form und Verfahren zur Herstellung und Reinigung dieser Proteine

Die Erfindung betrifft in Zellen produzierte, lösliche, amphipathische Proteine sowie ein Verfahren zum Isolieren und Reinigen dieser Proteine.

Alle physiologisch aktiven Zellen produzieren Proteine, die sie benötigen, um ihre jeweiligen Lebensfunktionen aufrechtzuerhalten. Die synthetisierten Proteine haben verschiedene Aufgaben. Einige wirken als Enzyme, d.h. sie katalysieren die Stoffwechselreaktion in der Zelle. Andere dienen dazu, die Lebensvorgänge des Organismus, zu dem die Zelle gehört, aufeinander abzustimmen und wieder andere bilden die Struktur der Zelle. Proteine, die in diesen Zellen produziert werden, können jedoch auch andere Organismen antigene Wirkungen haben, d.h. sie induzieren in diesen Organismen Immunreaktionen. Auch Viren sind Lebewesen, die, beispielsweise in ihrer Hülle, Proteine enthalten, die als Antigene wirken können.

Die Anweisungen für die Proteinsynthese befinden sich in den Genen der Zellen, die als funktionelle Einheiten der Erbsubstanz angesehen werden können. Es ist heute eine gut beherrschte Technik, die genetische Ausstattung einer Zelle, beispielsweise eines Bakteriums, zu verändern, indem man ein Gen, beispielsweise aus einer tierischen oder menschlichen Zelle, in eine andere Zelle, häufig eine Bakterienzelle, überträgt. Das Bakterium synthetisiert dann auch das Protein, für das das fremde, eingefügte Gen die Information enthält. Eins der bekanntesten Beispiele ist das in der Bauchspeicheldrüse des Menschen produzierte Insulin, dessen genetische Information in das Bakterium *Escherichia coli* übertragen wurde.

Die sowohl natürlicherweise als auch durch gentechnische Manipulation von Zellen produzierten Proteine werden entweder in den Überstand ausgeschleust oder häufen sich in der Zelle an und werden dann mit im Stand der Technik bekannten Methoden, nachdem die Zellen aufgebrochen wurden, isoliert und gegebenenfalls gelöst. Für diese Verfahren werden in der Regel nach bestimmten Fraktionierungs- und Reinigungsvorstufen Detergenzien verwendet, die für die einzelnen, zu isolierenden und zu reinigenden Proteine sehr spezifisch abgestimmt sein müssen. Es ist nach wie vor im Stand der Technik ein Problem, für die gewünschten Proteine die richtigen Detergenzien für die Isolierung und Reinigung zu finden.

Es war daher Aufgabe der Erfindung, Mittel und Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit denen in physiologisch aktiven Zellen produzierte Proteine isoliert und gereinigt werden können und dabei die biologische Aktivität der Proteine zu erhalten oder zu verbessern.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, daß Proteine zur Verfügung gestellt werden, die in Abwesenheit von Detergenzien in einer ersten, etwa sphäroiden, gegebenenfalls elektronenoptisch sichtbaren, aggregierten, elektrophoretisch nicht mobilen Form I und in Anwesenheit eines ersten, nicht denaturierenden Detergenz in einer zweiten, aufgelockerten, gegebenenfalls elektronenoptisch sichtbaren, aggregierten, elektrophoretisch nicht mobilen Form II und in Anwesenheit eines zweiten, nicht denaturierenden Detergenz in einer elektronenoptisch nicht sichtbaren, elektrophoretisch mobilen Form III vorliegen und die genannten Formen I, II und III in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Abwesenheit der genannten Detergenzien reversibel ineinander überführbar sind.

Bei Isolierungsverfahren von Proteinen hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bei der Verwendung nicht denaturierender Detergenzien amphipatische Proteine nicht in ihrer monomeren Form, sondern in aggregierten Formen vorliegen, die ganz überraschende vorteilhafte Eigenschaften aufweisen. In Abwesenheit eines nicht denaturierenden Detergenz weisen die aggregierten Formen eine kompakte Struktur auf, die hier als aggregierte Form I bezeichnet werden soll. In dieser Form sind die Partikel bestens geeignet zum Entfernen von Verunreinigungen, die auf der Oberfläche dieser Partikel sitzen. Die kompakte Form der Partikel sichert dabei einen gewissen Schutz vor Denaturierung der aktiven Zentren, seien es enzymatisch aktive Zentren oder Epitope, die Immunreaktionen hervorrufen. Dennoch sind auch die kompakten Partikel in der aggregierten Form I bioaktiv, jedoch elektrophoretisch nicht mobil.

In Anwesenheit eines nicht denaturierenden Detergenz läßt sich die kompakte sphärische Form I der aggregierten Proteine in eine mehr oder weniger aufgelockerte Form überführen, die im Laufe eines Isolierungs- und Reinigungsverfahrens den Vorteil aufweist, daß Verunreinigungen entfernt werden können. In der Form II der durch das Auffalten der Form I in die Form II leichter zugänglich werden. In der Form II der aggregierten Proteine verstärken sich weiterhin überraschenderweise die biologischen Aktivitäten der Proteine. Es zeigte sich beispielsweise daß die Immunogenizität der isolierten Proteine ansteigt, wenn die biologische Eigenschaft der isolierten Proteine in der immunisierenden Antigenizität der Proteine liegt. Die biologisch aktiven Proteine, oder gegebenenfalls auch Teile dieser Proteine, die eine biologische Aktivität aufweisen, sind somit insbesondere in der aufgeweiteten Form aktiv und eignen sich in dieser etwa wolkigen Form aus den genannten Gründen besonders gut für die Reinigung der Proteine von Bestandteilen, die in den aggregierten Formen eingeschlossen sind.

Die Proteine in der aggregierten Form II sind ebenfalls elektrophoretisch nicht mobil.

Das besonders überraschende an den erfindungsgemäß zur Verfügung gestellten, partikulären, aggregierten Proteinen ist der Umstand, daß die aggregierten Formen I und II reversibel ineinander überführbar sind, in Abhängigkeit von der Abwesenheit oder Anwesenheit eines ersten nicht denaturierenden Detergenz.

5 Mit den beschriebenen partikulären aggregierten Proteinen wird somit ein immens zweckmäßiger Komplex zur Verfügung gestellt, der durch die Reversibilität des Ineinanderüberführens der verschiedenen Formen I und II dieser Aggregate im Hinblick auf ein erleichtertes Reinigungsverfahren, eine verbesserte Lagerungsmöglichkeit sowie eine erhöhte Wirksamkeit der biologischen Aktivität der isolierten Proteine enorme Vorteile aufweist.

10 Wenn ein zweites nicht denaturierende Detergenz gezielt eingesetzt wird, können die Proteine aus der aggregierten Form II in die monomere Form III der Proteine überführt werden, wobei sodann völlig unerwarteterweise auch dieser Zustand reversibel ist, wenn das zweite, nicht denaturierende Detergenz entfernt wird. In Abhängigkeit von der Abwesenheit bzw. Anwesenheit der nicht denaturierenden Detergenzien könne aus physiologisch aktiven Zellen zu isolierende Proteine somit gezielt und manipulierbar  
15 reversibel in jede gewünschte und für den gerade bezweckten Verfahrensschnitt bzw. Verwendungszweck optimale Form überführt werden.

Für die Lagerung bzw. eine dosierte, gegebenenfalls gewünschte, reduzierte biologische Aktivität der isolierten Proteine ist eine aggregierte Form I in etwa sphärischer Struktur bevorzugt. Die kugelige Form schützt weiterhin gegebenenfalls bei Reinigungsschritten eventuelle sensitive aktive Zentren vor eventuell  
20 denaturierenden Behandlungsschnitten.

Die aggregierte Form II wird je nach Dauer der Behandlung und Konzentration einer nicht denaturierenden Detergenz eine etwa wolkige Struktur aufweisen. Je nach dem Auffaltungsgrad sind die Proteine weiteren Reinigungsschritten zugänglich bezüglich solcher Verunreinigungen, die beispielsweise von den für die Produktion der Proteine verwendeten Wirtszellen bzw. Vektorsystemen stammen können. Die  
25 biologische Aktivität der Proteine ist erhöht.

Sowohl die sphäroide, aggregierte Form I als auch die etwa wolkige, aggregierte Form II können elektronenoptisch sichtbar gemacht werden, wenn das produzierte Einzelprotein ein Molekulargewicht aufweist, das mindestens 10 000 Dalton beträgt. Wenn jedoch beispielsweise durch genetische Manipulation nur bestimmte antigene Determinanten exprimiert werden, die Proteine mit nur wenigen Aminosäuren  
30 darstellen, könnten auch die aggregierten, mehrere Proteine enthaltenden Formen I und II unterhalb der elektronenoptischen Sichtbarkeit liegen.

Vorzugsweise liegen die in den Formen I und II aggregierten, elektrophoretisch nicht mobilen Proteine in einer Reinheit von 80%, vorzugsweise 98% vor, d.h. daß die aggregierten Formen I und II die gewünschten Proteine in verhältnismäßig homogener Ansammlung enthalten.

35 Das Aggregieren der Proteine innerhalb der Zellen tritt bevorzugt dann auf, wenn die Proteine Expressionsprodukte gentechnisch manipulierter Zellen sind und in diesen Zellen wiederum insbesondere dann, wenn die Produkte mit bekannten Methoden in diesen Zellen überproduziert werden. Die Überproduktion kann erfolgen, indem entweder mehrere Vektoren, die das Gen enthalten, die das gewünschte Protein exprimieren, vorliegen oder wenn besonders starke Promotoren vor die entsprechenden Gene  
40 geschaltet sind. Soweit es sich bei den exprimierten Proteinen dann um solche handelt, die in der Zelle löslich sind, aggregieren sie sich zu den beschriebenen sphärischen Partikeln.

Die von den genetisch manipulierten Wirtszellen exprimierten Proteine weisen bevorzugt eine antigene Funktion auf. Diese Proteine sind bevorzugte Projekte für die genmanipulierte Expression von Proteinen, wenn Lebendimpfstoffe zur Verfügung gestellt werden sollen, bzw. durch die Antigene eine entsprechende  
45 aktive Immunisierung bezweckt ist. Es handelt sich dabei insbesondere um Hüllproteine pathogener Viren, seien es humanpathogene oder tierpathogene Viren.

Vorzugsweise handelt es sich bei den isolierten Proteinen um Glycoproteine, beispielsweise das Glycoprotein GP 160, des HIV oder ein Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus. Die Gene für die Expression der jeweiligen Proteine können zum Beispiel durch einen Vaccinia-Virusvektor in einem  
50 Säugetierzellsystem exprimiert. Das Verfahren, wie spezifische Gene in Vaccinia-Virusvektoren inseriert werden, ist bei Mackett et al. (J. Virol., 49, S. 857-846, 1984) beschrieben. In an sich im Stand der Technik derzeit bekannter Weise wird das fremde Gen zuerst in einen Plasmidvektor stromabwärts von einem Vaccinia-Transkriptions-Kontrollelement (7,5 K-Promotor) inseriert. Dieses chimäre Gen in dem rekombinanten Plasmid wird durch Vaccinia-Sequenzen flankiert, die für das virale Thymidinkinasegen (TK) codieren.  
55 Das Plasmid wird sodann in Zellen eingeführt, die vorher mit einem Wildtyp-Vacciniavirus (Stamm WR) infiziert wurde. Die Rekombination geschieht dann in der TK-Region, die sowohl für die virale DNA als auch das Plasmid homolog ist und die Insertion des chimärischen Gens in das Genom des Vaccinia-Virus erlaubt. Das auf diese Weise erhaltene rekombinante Virus weist den Phänotyp TK<sup>-</sup> auf, ist also nicht mehr

in der Lage, die Thymidinkinase zu produzieren und wächst in Selektivmedium, das 5-Bromdeoxyuridin enthält. Auf diese Weise können rekombinante Vaccinia-Viren hergestellt werden, die jeweils Gene tragen, die Proteine, gegebenenfalls in Überproduktion, produzieren, die sich sodann in den Säuretierzellen zu den geschickten, eine Vielzahl der einzelnen Proteine enthaltenden aggregierten Formen zusammenlagern.

5 Ähnliche Expressionssysteme sind für andere antigene Proteine bekannt. Beispielsweise sind einige Vaccinia-Virus-Rekombinanten konstruiert worden, die für die Oberflächenantigene des Hepatitis B-Virus codieren. Zu diesem Zweck wurden die Hepatitis-B-Virus-Oberflächen-Antigene unter den regulativen Mechanismen des Vaccinia-Virus exprimiert, wobei eine Anzahl von vaccinia-spezifischen Promotoren verwendet wurden mit dem Ziel, das Expressionsniveau für die fremden Gene zu erhöhen. Es wurden

10 weiterhin Vaccinia-Virus-Rekombinante hergestellt, die mehr als ein Hepatitis B-Virusgen exprimieren.

Ganz allgemein wird an dieser Stelle bezüglich der Herstellung rekombinanter Expressionssysteme zum Zwecke des gentechnischen Produzierens von gewünschten Proteinen auf Winnacker, E.L. (Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie, VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1984) verwiesen.

Die biologische Funktion der in den genannten Zellen exprimierten Proteine, die in aggregierten, viele

15 Proteine enthaltenden Formen vorliegen können, kann vorzugsweise eine enzymatische Funktion sein. Insbesondere in der aggregierten Form II wird eine verstärkte enzymatische Funktion beobachtet, die damit zusammenhängen kann, daß die enzymatisch aktiven Zentren in der aufgelockerten aggregierten Form II frei liegen und dennoch eine räumlicher Zusammenhang aller enzymatisch aktiver Proteine vorliegt, so daß die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der durch die enzymatische Aktivität der genannten Proteine

20 umzusetzenden Produkte mit den enzymatisch aktiven Bereichen erhöht ist.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem enzymatischen Protein um den Blutgerinnungsfaktor VIII. Die gentechnische Herstellung des F VIII ist im Stand der Technik mehrfach beschrieben worden. Die in partikulären Formen angesammelten Proteine können vorzugsweise an eine weitere Substanz, insbesondere ein hochmolekulares Protein durch Konjugation gebunden werden, wodurch eine Verbesserung bezüglich

25 der Stabilität, Aktivität, in vivo-Wiedergewinnung und biologischen Halbwertszeit der Protein erreicht wird. Ein Beispiel für eine derartige Konjugation gewünschter Proteine mit weiteren hochmolekularen Substanzen stellt der Blutgerinnungsfaktor VIII mit dem von Willebrands-Faktor dar.

Die partikulär aggregierten Proteine liegen bevorzugt in eukaryontischen Zellen, insbesondere tierischen oder humanen Zellen vor.

30 Besonders bevorzugt werden dabei die gewünschten Proteine in primären Zellkulturen oder aus Zelllinien gewonnene Verozellen, CHO-Zellen oder primären Hühnerembryofibroblastenzellen exprimiert. Die genannten Wirtszellen sind als Expressionssystem bevorzugt, da hier bereits die nach der Translation erfolgenden Modifikationen in einer Weise vorliegen, wie sie bei den zu verwendenden Endprodukten gewünscht sind, wie beispielsweise die Glycosylierung der exprimierten Proteine. Diese glycosylierten

35 Proteine lagern sich sodann zu der partikulären Form zusammen, die die beschriebenen sphärischen Formen I bzw. wolkigen Formen II nach Behandlung mit einem ersten, nicht denaturierenden Detergenzien annehmen können, und nach Behandlung mit einem zweiten nicht denaturierenden Detergenz in eine dritte aggregierte Form III überführt werden können.

Verozellen sind besonders bevorzugt für die Herstellung des Glycoprotein 160 des HIV, wie es oben

40 beschrieben wurde. Dieses Zellsystem wurde ausgewählt, da es eine verhältnismäßig schnelle Wachstumsrate hat und für die Herstellung menschlicher Impfstoffe bereits gut adaptiert ist. Die Infektion von Verozellen mit einem rekombinanten Vacciniavirus, das ein Gen enthält, das das gewünschte, nach dem vorliegenden, erfinderischen Verfahren zu isolierende Protein exprimiert, resultiert in normaler Synthese des gewünschten Proteins, dessen Glycosylierung sowie eventuellen Weiterprozessierungsschritten. Durch die

45 Verwendung eines Doppel-Infektionssystems mit zwei Rekombinanten kann die Menge des gewünschten Proteins erheblich gesteigert werden. Dieses System beinhaltet eine Rekombinante, die die Polymerase des Phagen T7 unter der Steuerung des P7.5-Promotors von Vaccinia exprimiert. Diese Rekombinante wird zusammen mit einer Rekombinante infiziert, die den T7-Promotor und das Glycoprotein 160 Gen des HIV enthält. Der T7-Promotor ist ein sehr starker Promotor und sichert ein hohes Niveau der Expression,

50 beispielsweise eine etwa 10fache Menge des gewünschten Proteins.

Die beschriebenen Systeme sind als bevorzugte Systeme zu verstehen. Eine allgemeine Übersicht über die vielfältigen Möglichkeiten, bestimmte Vektoren für die Rekombination gewünschter Gene zu verwenden und diese Vektoren in gewünschten Zellen zu vermehren und die durch die Fremdgene exprimierten Proteine herzustellen findet sich beispielsweise in Genetic Engineering 3, Academic Press, Edited by

55 Robert Williamson, (1982) oder in Spektrum der Wissenschaft, Industrielle Mikrobiologie (1985).

Die nicht denaturierenden Detergenzien, deren Anwesenheit oder Abwesenheit das Vorliegen der aus den physiologisch aktiven Zellen isolierten Proteine in voneinander verschiedenen aggregierten Formen oder in monomerer Form der Proteine wesentlich beeinflusst, ist vorzugsweise ein bestimmtes ionisches.

nonionisches oder zwitterionisches Detergenz. Es ist in der Proteinchemie bzw. bei den Protein-Reinigungs-  
verfahren ein bekanntes Problem, daß die Wahl des Detergenz für die Wiedergewinnung des gewünschten  
Proteins in einerseits hochgereinigter Form, andererseits in biologisch aktivem Zustand jedesmal eine  
Herausforderung darstellt. Es hat sich nun überraschenderweise herausgestellt, daß durch die Ver-  
wendung  
5 von nicht denaturierenden Detergenzien, bestimmten ionischen, nonionischen oder zwitterionischen Charak-  
ters die obengenannten Forderungen an ein Protein-Reinigungsverfahren voll erfüllt werden können, wobei  
zusätzlich die unerwartete Konfigurationsänderung zusammengeballter Proteine, wie sie in den diese  
Proteine produzierenden Zellen vorliegen, die genannten Forderungen in verblüffender Weise optimal  
erfüllen. Wie bereits erwähnt, wird insbesondere in der aggregierten Form II, der aufgelockerten oder  
10 wolkigen Konfiguration, die dem einzelnen Protein innewohnende biologische Aktivität, sei sie enzymati-  
scher oder antigener Natur, deutlich verstärkt.

Ein bevorzugtes, nonionisches Detergenz ist das Octylglycosid oder eins der Derivate dieses Deter-  
genz, vorzugsweise in Konzentrationen von 0,25 - 5%, insbesondere 1%.

Ebenso bevorzugt ist die Verwendung des Detergenz der Salze der Gallensäure sowie eines seiner  
15 Derivate, bevorzugt das Detergenz Deoxycholat (DOC), das insbesondere geeignet ist, im Zusammenhang  
mit der Isoiierung und Reinigung der sphärischen Konfiguration vieler Proteine des Glycoproteins 160 des  
HIV, wenn dieses sowohl unter Verwendung des genannten Detergenz gereinigt wird, und in Konzentratio-  
nen von 0,25 - 5%, vorzugsweise 1%, als auch wenn das Deoxycholat bei der Applikation des GP 160,  
beispielsweise in Verbindung mit Aluminiumhydroxid verwendet wird.

20 Das nicht denaturierende Detergenz, das für die Überführung der aggregierten Proteine aus der Form II  
in die monomere Form III bevorzugt zu verwenden ist, ist ein zwitterionisches Detergenz der Zwittergent-  
Reihe, eben falls in Konzentrationen von 0,25 - 5%, vorzugsweise 1%.

Die Proteine in der aggregierten Form I eignen sich, wie bereits erwähnt, besonders gut für die stabile  
Lagerung der Proteine. Sie können jedoch auch für die gewünschten biochemischen Umsetzungen oder  
25 Reaktionen verwendet werden, da auch die in der aggregierten Form I zusammengeballten Proteine  
biologische Aktivität aufweisen.

Die Verwendung von Proteinen in der aggregierten Form II geschieht bevorzugt zum Verstärken der  
biologischen Funktion der Proteine.

Jedwede aggregierte Form der Proteine eignet sich für eine therapeutische, prophylaktische oder  
30 diagnostische Anwendung, sowohl in den beschriebenen sphäroiden, wolkigen oder monomeren Formen,  
als auch in den obenbeschriebenen konjugierten Formen mit weiteren hochmolekularen Proteinen.

Eine weitere Verwendung der aggregierten Proteine liegt in der Substitutionsbehandlung, der Gewin-  
nung von Impfstoffen oder monoklonalen Antikörpern sowie zur Gewinnung von Substanzen zum qualitati-  
ven Nachweis und quantitativen Bestimmen solcher Substanzen in Körperflüssigkeiten.

35 Neben den aus einer Anzahl von Proteinen bestehenden Partikeln, die in Abhängigkeit von Anwesenheit  
oder Abwesenheit eines nicht denaturierenden Detergenz in morphologisch verschiedenen Konfigurationen  
vorliegen, in die sie reversibel ineinander überführt werden können, bezieht sich die vorliegende Erfindung  
auf ein Verfahren zum Isolieren und Reinigen der gewünschten Proteine, die in Zellen, bevorzugt gentech-  
nisch manipulierten Zellen, produziert werden, wobei in einem ersten Reinigungsschritt die von den in einer  
40 ersten aggregierten Form I vorliegenden Proteinen an der Oberfläche befindliche Verunreinigungen entfernt  
werden, die Proteine sodann unter Verwendung eines nicht denaturierenden Detergenz in eine zweiten  
aggregierten Form II überführt werden und in einem zweiten Reinigungsschritt die in dieser aggregierten  
Form II zugänglichen Verunreinigungen entfernt werden und durch Zugabe eines zweiten, nicht denaturie-  
renden Detergenz die Proteine in eine monomere Form III überführbar sind, und die Proteine durch  
45 Entfernen der nicht denaturierenden Detergenzien reversibel wieder in die aggregierten Formel I und II  
überführbar sind.

Die immensen Vorteile dieses Verfahrens sind im wesentlichen oben bereits diskutiert und liegen in der  
reversiblen Überführbarkeit der verschiedenen aggregierten Formen der Proteine ineinander.

Die etwa sphärische Form I erlaubt durch die kompakte Anordnung der Proteine beispielsweise eine  
50 erleichterte erste Reinigung von beispielsweise Medienbestandteilen von der Oberfläche der quasi kugeli-  
gen Proteinzusammenballung. Wenn sodann der zweite Reinigungsschritt von Verunreinigungen, die in der  
aggregierten Form II durch die Auffaltung besonders leicht zugänglich sind, abgelaufen ist, kann durch  
Entzug des nicht denaturierenden Detergenz reversibel die aggregierte Form I wieder hergestellt werden, in  
der beispielsweise aktive Zentren der Proteine besonders gut geschützt im Inneren der sphärischen  
55 Proteinanordnungen liegen, so daß eine besonders gute Lagerung der Proteine in der aggregierten Form I  
möglich ist. Die aggregierte Form II hat, wie bereits erwähnt, neben den Vorteilen hinsichtlich der  
erleichterten Reinigung von Zellbestandteilen der Wirtszelle, in denen die Proteine exprimiert wurden bzw.  
von Vektoren, die rekombinativ das Gen für die isolierten Proteine enthalten, den weiteren Vorteil, daß die

biologische Aktivität der Proteine durch die räumliche Nähe vieler aktiver Zentren durch den speziellen aggregierten Zustand der Proteine wesentlich verstärkt werden kann.

Je nach Versuchsanordnung werden Zellen oder Zellmembranen abzentrifugiert und mit einer Pufferlösung, die ein nicht denaturierendes Detergenz sowie ein Proteasehemmsystem enthält, extrahiert, oder, wenn die gewünschte, hochmolekulare Substanz von den Zellen in den Überstand abgegeben wird, wird dieser Überstand mit dem nicht denaturierenden Detergenz und dem Proteasehemmsystem versetzt, wobei das nicht denaturierende Detergenz beispielsweise Deoxycholat (DOC), in Konzentrationen von etwa 0.25 bis 5%, vorzugsweise jedoch 1%, vorliegt.

Die so erhaltenen Lösungen werden, wenn es sich bei der zu isolierenden und reinigenden Substanz um ein Glycoprotein handelt, mittels Lektinen, die an eine Festmatrix gekoppelt sind, ankonzentriert und von nicht kohlehydrathaltigen Verunreinigungen abgetrennt. Das verwendete, nicht denaturierende Detergenz hat bei diesem Schritt zusätzlich zur Eigenschaft, die Substanz in die Form II zu überführen, das Vermögen, eine unspezifische Adsorption zu verhindern. Das Eluieren erfolgt mit Glykosiden.

Ein weiterer, wesentlicher Reinigungsschritt kann durch spezielle Bindung der vorgereinigten, hochmolekularen Substanz an eine Immunadsorptionssäule erreicht werden. Nach ausreichendem Waschen mit einem Puffer wird mit einem chaotropen Agens, beispielsweise Harnstoff oder KSCN (2 - 8 M, vorzugsweise 3 M) eluiert. Durch anschließende Dialyse gegen einen Puffer wird in die partikuläre Form I überführt. Ist es erforderlich, wird die hochmolekulare Substanz durch ein bestimmtes, zwitterionisches Detergenz in die monomere Form III überführt und durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Durch Dialyse gegen einen detergentenfreien Puffer werden aus der monomeren Form III die aggregierten Formen II oder I wieder hergestellt.

Die verschiedenen aggregierten Formen der in den beschriebenen Zellen produzierten Proteine, können elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Die Erfindung wird im folgenden detailliert anhand der Figuren und der Beispiele erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1:

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Glycoproteins 160 in tris-Puffer in 278.640-facher Vergrößerung.

Die Proteine liegen in der kompakten, sphärischen aggregierten Form I vor.

Fig. 2:

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Glycoproteins 160 des HIV in einem Puffer, der 1% DOC enthält.

Die Proteine liegen in der lockeren, wolkigen aggregierten Form II vor.

Beispiel 1

Isolieren und Reinigen des Glycoprotein 160 des HIV. Das Isolieren und Reinigen des Glycoprotein 160 des HIV erfolgt nach folgendem Schema:

1. Gentechnisch manipulierte Verozellen, die das Glycoprotein 160 des HIV produzieren, werden bei einer gewünschten Dichte zentrifugiert.

2. Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet wird in TBS pH 7,4 plus 1mM CuSO<sub>4</sub> plus 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub> resuspendiert.

3. Das resuspendierte Pellet wird einer Extraktion mit 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 1% DOC, 1mM CuSO<sub>4</sub> und 0,5 mM ZnCl<sub>2</sub> unterworfen. Die Suspension wird 30 Minuten lang bei 25 °C durch Zentrifugieren geklärt.

4. Der Überstand wird einer Lentil-Lectin-Chromatographie unterworfen, indem man die gewünschten Proteine an eine Säule adsorbiert und mit DOC-Puffer wäscht. Die Proteine werden mit 5% Methylglycosid in einem Waschpuffer eluiert.

5. Das Eluat aus der Lectin-Säule wird in Tween-Puffer verdünnt. Sodann erfolgt eine Adsorption an eine Immunaффinitäts-Chromatographiesäule, die mit TBS-Tween und anschließend TBS gewaschen wird. Es folgt eine DNAse und RNAse-Behandlung. Es wird mit 3M KSCN eluiert und gegen detergentenfreien Puffer dialysiert.

6. Das dialysierte Eluat wird mit 1% Zwittergent und 5% Betain justiert und sodann an eine Mono-Q-Matrix als Anionenaustauscher adsorbiert und sodann mit einem KSCN-Gradienten eluiert und gegen einen Puffer dialysiert.

7. Es erfolgt eine zweite Lentil-Lectin-Chromatographie durch Adsorbieren und Waschen mit detergentenfreien Puffer. Das Eluieren erfolgt mit 5%igem Methylglycosid, gefolgt von einer Dialyse gegen TBS. Mit diesem Verfahrensschritt erfolgt eine Konzentrierung der Proteine.

5

## Beispiel 2

Mit dem wie im Beispiel 1 beschriebenen Verfahren gereinigten Glycoprotein (GP) 160 des HIV wurde ein Potency-Test durchgeführt, der die immunogene Wirksamkeit des Glycoproteins 160 in kompakter, sphärischer Form I, sowie in aufgelockerter, wolkiger Form II, zeigt.

Pro Vaccine werden 5 Verdünnungen mit 10 µg, 2,5 µg, 0,625 µg, 0,158 µg sowie 0,04 µg GP 160/ml hergestellt. Pro Verdünnung werden 10 BALBc Mäuse subcutan immunisiert; pro Vaccinenart werden demnach 50 Tiere benötigt. Beim vorliegenden Versuch wurden vier verschiedene Adsorptionsmethoden

15 getestet.

1. GP 160 + 0,2% Al(OH)<sub>3</sub>
2. [GP 160 + 0,25% DOC] + 0,2% Al(OH)<sub>3</sub>
3. [GP 160 + 0,25% DOC] + [0,2% Al(OH)<sub>3</sub> + 0,25% DOC]
4. [GP 160 + 0,25% DOC] + [0,2% Al(OH)<sub>3</sub>] gewaschen

20

Alle Tiere wurden mit 1 ml subcutan immunisiert und nach sechs Wochen einzeln entblutet. Das Serum jedes einzelnen Tieres wurde mittels Anti-HIV ELISA (SORIN) auf das Vorhandensein von GP 160 Antikörpern untersucht, wobei für jede Vaccinenart die effektive Dosis 50 von GP 160 anhand der reagierenden Tiere mittels der bekannten Spearman-Kärber-Methode berechnet wurde.

25

## Ergebnisse

30

1. I - V 10 µg GP 160/ml + 0,2% Al(OH) <sub>3</sub> s.c.			
		reag. Tiere	Titer max.
I	conz.	1	100
II	1:4	1	10
III	1:16	0	.
IV	1:64	1	10
V	1:256	1	10
ED <sub>50</sub> : 10 µg/ml GP 160			

35

40

45

2. VI - X 10 µg (GP 160/ml + DOC + 0,2% Al(OH) <sub>3</sub> s.c.			
		reag. Tiere	Titer max.
VI	conz.	7	1000
VII	1:4	5	200
VIII	1:16	1	10
IX	1:64	0	.
X	1:256	0	.
ED <sub>50</sub> : 3,3 µg/ml GP 160			

50

55



3. XI - XV 10 ug GP 160/ml + DOC + DOC-Al(OH) <sub>3</sub> s.c.			
		reag. Tiere	Titer max.
XI	conz.	7	800
XII	1:4	5	1000
XIII	1:16	6	100
XIV	1:64	2	100
XV	1:256	1	100
ED <sub>50</sub> : 1,09 ug/mml GP 160			

4. XVI - XX 10 ug GP 160/mml + DOC + Al(OH) <sub>3</sub> gewaschen s.c.			
		reag. Tiere	Titer max.
XVI	conz.	0	.
XVII	1:4	1	10
XVIII	1:16	0	.
XIX	1:64	0	.
XX	1:256	0	.
ED <sub>50</sub> : 10 ug/ml GP 160			

Das Ergebnis des Potency Tests des Glycoproteins 160 des HIV zeigt die unterschiedliche Immunogenität des Glycoproteins 160 in Abhängigkeit der aggregierten Form. Der ED<sub>50</sub>-Wert, der diejenige Menge der verwendeten Substanz bezeichnet, bei der 50% der geimpften Tiere serokonvertieren, verringert sich erheblich, wenn das Detergenz DOC anwesend ist. In Anwesenheit des Detergenz DOC liegt das Glycoprotein 160 in der aggregierten Form II vor, in der die antigenen Epitope einerseits freiliegen, andererseits jedoch räumlich zusammenhängen, so daß eine verstärkte Immunantwort erfolgt.

Die Erfindung wurde exemplarisch am Glycoprotein 160 des HIV illustriert. Sie ist jedoch keineswegs auf dieses Protein beschränkt.

#### Ansprüche

1. In Zellen produzierte, lösliche, amphipatische Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß sie in Abwesenheit von Detergenzien in einer ersten, etwa sphäroiden, gegebenenfalls elektronenoptisch sichtbaren aggregierten, elektrophoretisch nicht mobilen Form I und in Anwesenheit eines ersten, nicht denaturierenden Detergenz in einer zweiten, aufgelockerten, gegebenenfalls elektronenoptisch sichtbaren, aggregierten, elektrophoretisch nicht mobilen Form II und in Anwesenheit eines zweiten, nicht denaturierenden Detergenz in einer elektronenoptisch nicht sichtbaren, elektrophoretisch mobilen Form III vorliegen und die genannten Formen I, II und III in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Abwesenheit der genannten Detergenzien reversibel ineinander überführbar sind.
2. Proteine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer mindestens 80%igen, vorzugsweise 98%igen Reinheit vorliegen.
3. Proteine nach mindestens einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine Expressionsprodukte gentechnisch manipulierter Zellen, insbesondere solcher sind, die die Proteine überproduzieren.
4. Proteine nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine antigene Funktion aufweisen.
5. Proteine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es Glycoproteine, bevorzugt das Glycoprotein 160 des HIV oder Oberflächenproteine des Hepatitis B-Virus sind.

6. Proteine nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine enzymatische Funktion aufweisen.

7. Proteine nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Blutgerinnungsfaktoren handelt.

8. Proteine nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie an eine weitere Substanz, vorzugsweise ein hochmolekulares Protein, durch Konjugation gebunden sind, wodurch eine Verbesserung bezüglich der Stabilität, Aktivität, in vivo-Wiedergewinnung und biologischen Halbwertszeit der Proteine erreichbar ist.

9. Proteine nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen eukaryontische, bevorzugt tierische oder humane, Zellen sind.

10. Proteine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen aus primären Zellkulturen oder aus Zelllinien gewonnen werden, insbesondere Verozellen, CHO-Zellen oder primäre Hühnerembryo-fibroblastenzellen sind.

11. Proteine nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detergenzien bestimmte ionische, nonionische oder zwitterionische Detergenzien sind.

12. Protein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als erstes, nonionisches Detergenz Octylglucosid oder ein Derivat von diesem, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%, und als zweites, zwitterionisches, Detergenz eins der Zwittergent-Reihe, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%, verwendet wird.

13. Protein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergenz ein Salz der Gallensäure ist oder ein Derivat von diesem, bevorzugt das Detergenz Deoxycholat (DOC), vorzugsweise, in einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%.

14. Verwendung von Proteinen nach einem der vorhergehenden Ansprüche in ihrer aggregierten Form I zum stabilen Lagern der Proteine.

15. Verwendung von Proteinen nach einem der vorhergehenden Ansprüche in ihrer aggregierten Form II zum verstärken der biologischen Funktion der Proteine.

16. Verwendung von Proteinen nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung in ihrer nativen oder konjugierten Form.

17. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 16 zum Gewinnen von Impfstoffen.

18. Verwendung von Proteinen nach einem der Ansprüche 16 oder 17 zur Gewinnung von Substanzen zum qualitativen Nachweis oder quantitativen Bestimmen der genannten Substanzen in Körperflüssigkeiten.

19. Verfahren zum Isolieren und Reinigen amphipathischer Proteine, die in Zellen produziert werden, dadurch gekennzeichnet, daß in einem ersten Reinigungsschritt von den, in einer ersten aggregierten Form I vorliegenden Proteinen die an der Oberfläche befindlichen Verunreinigungen entfernt werden, die Proteine sodann unter Verwendung eines nicht denaturierenden Detergenz in eine zweite aggregierte Form II überführt werden und in einem zweiten Reinigungsschritt die in dieser aggregierten Form II zugänglichen Verunreinigungen entfernt werden und durch Zugabe eines zweiten, nicht denaturierenden Detergenz die Proteine in eine monomere Form III überführbar sind und die Proteine durch Entfernen des nicht denaturierenden Detergenz reversibel wieder in die aggregierten Formen I oder II überführbar sind.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die aggregierte Form I eine etwa sphärische Struktur aufweist und für eine stabile Lagerung geeignet ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die aggregierte Form II eine etwa wolkige Struktur aufweist und eine biologische Aktivität aufweist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß zu Reinigungszwecken das reversible Überführen der aggregierten Formen I, II und III mehrfach durchgeführt wird.

23. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine Expressionsprodukte gentechnisch manipulierter Zellen, insbesondere solcher sind, die die Proteine überproduzieren.

24. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine antigene Funktion aufweisen.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein das Glycoprotein 160 des HIV oder ein Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus ist.

26. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine eine enzymatische Funktion aufweisen.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine Blutgerinnungsfaktoren sind.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine an eine weitere Substanz, vorzugsweise ein hochmolekulares Protein, durch Konjugation gebunden sind, wodurch eine Verbesserung bezüglich der Stabilität, Aktivität, in vivo-Wiedergewinnung und biologischen Halbwertszeit der Proteine erreichbar ist.

5 29. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen eukaryontische, bevorzugt tierische oder humane Zellen sind.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen aus primären Zellkulturen oder aus Zelllinien gewonnen werden, insbesondere Verozellen, CHO-Zellen oder primäre Hühnerembryofibroblastenzellen sind.

10 31. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 19 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Detergenzien bestimmte ionische, nonionische oder zwitterionische Detergenzien sind.

32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß als erstes, nonionisches Detergenz Octylglucosid oder ein Derivat von diesem, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%, und als zweites, zwitterionisches, Detergenz eins der Zwittergent-Reihe, vorzugsweise in

15 einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%, verwendet wird

33. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergenz ein Salz der Gallensäure oder ein Derivat von diesem ist, bevorzugt das Detergenz Deoxycholat (DOC), vorzugsweise in einer Konzentration von 0,25 bis 5%, insbesondere 1%.

20

25

30

35

40

45

50

55

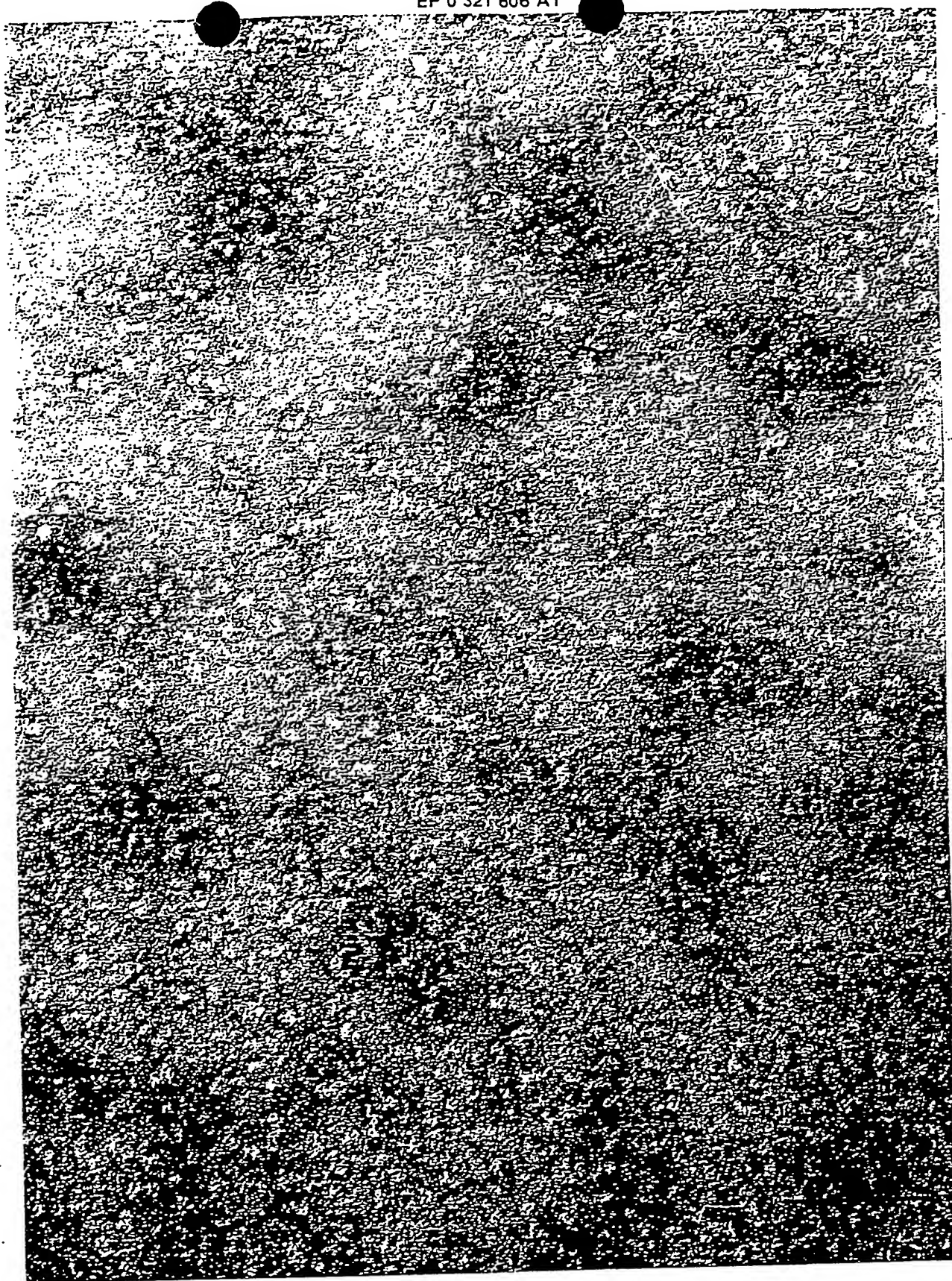


FIG. 1

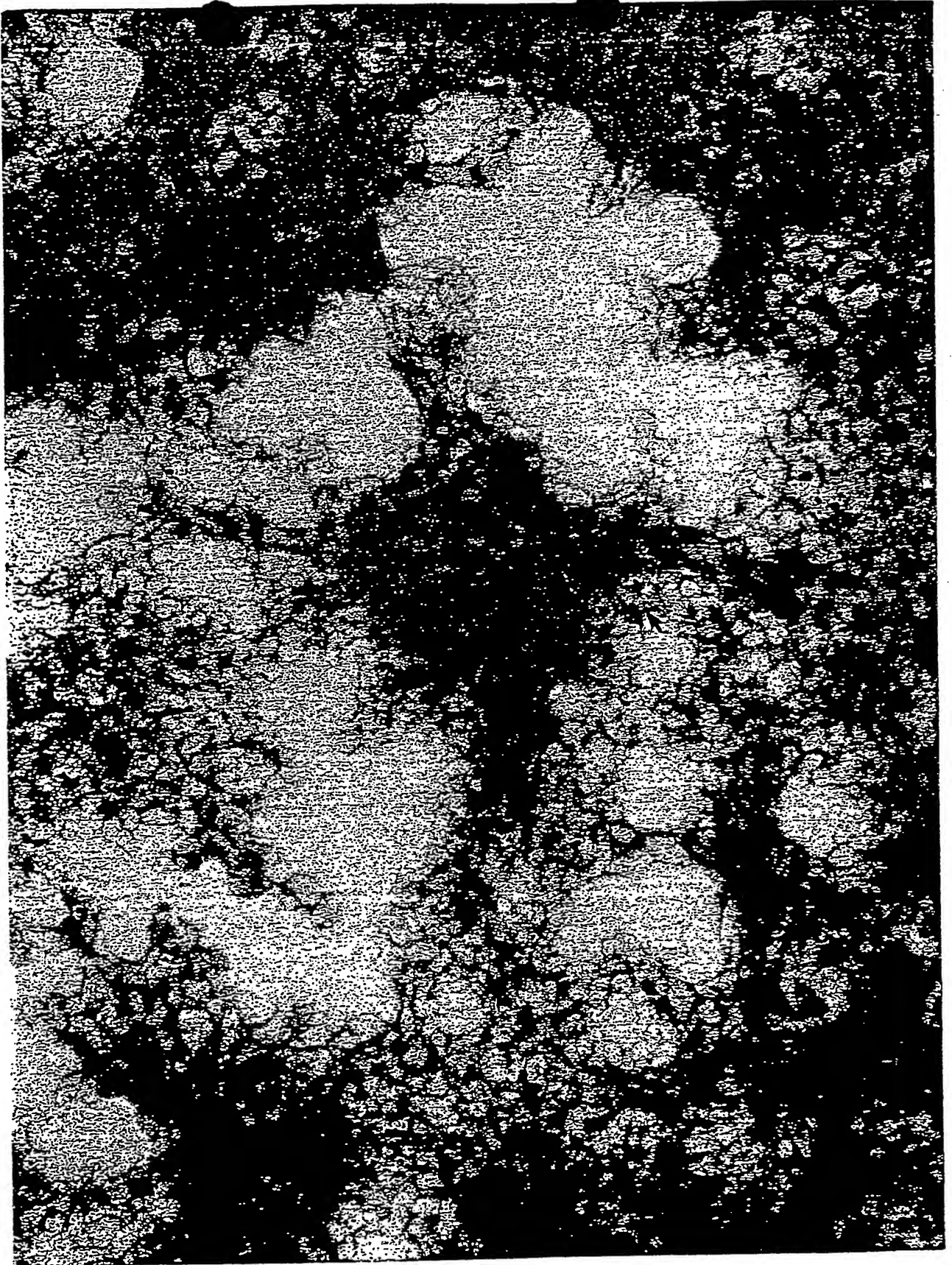


FIG. 2





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 87 11 9172

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X	BIOTECHNOLOGY, Band 3, Nr. 6, Juni 1985, Seiten 561-566, New York, US; M.-L. MICHEL et al.: "Expression of amplified hepatitis B virus surface antigen genes in chinese hamster ovary cells" * Seite 564, rechte Spalte: "Characterization of HBsAg particles from CHO clones" *	1-5,9-11	C 07 K 3/00 C 12 P 21/02 A 61 K 37/02
A	NATURE, Band 290, 5. März 1981, Seiten 51-54, Macmillan Journals Ltd, London, GB; J. SKELLY et al.: "Hepatitis B polypeptide vaccine preparation in micelle form" * Insgesamt *	1-11	
A	EP-A-0 233 044 (CAMBRIDGE BIOSCIENCE CORP.) * Seite 32 *	1-33	
A	EUR. J. BIOCHEM., Band 155, 1986, Seiten 453-468, FEBS, Elsevier, (North Holland), NL; K. MARTINEK et al.: "Micellar enzymology" * Seite 455 *	1-33	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4) C 07 K 3/00 C 12 P 21/00 A 61 K 37/00
A	"METHODS IN ENZYMOLOGY", Band 104, "Enzyme Purification and Related Technique", 1984, Teil C, edited by W.B. JAKOBY, Seiten 305-318, Academic Press, Inc., Orlando, US; L.M. HJELMELAND et al.: "Solubilization of functional membrane proteins" * Insgesamt, besonders Seite 308, Figur 1; Seite 315, Figur 4 * --- -/-	1-33	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 25-08-1988	Prüfer HERMANN R.R.W.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur		I: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument --- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P0403)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Seite 2

Nummer der Anmeldung

EP 87 11 9172

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
A	"METHODS IN ENZYMOLOGY", Band 104, "Enzyme Purification and Related Technique", 1984, Teil C, edited by W.B. JAKOBY, Seiten 329-339, Academic Press, Inc., Orlando, US; J. VAN RENSWOUDE et al.: "Purification of integral membrane proteins" * Insgesamt * -----	1-33	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 25-08-1988	Prüfer HERMANN R.R.W.
<b>KATEGORIE DER GENANTEN DOKUMENTE</b> X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			